

Aus der Abteilung für Zytopathologie
(Leiter: Prof. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Messungen der DNA in den Zellkernen karzinomatöser
Ergüsse mit dem Durchflußzytophotometer

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sibylle Westenberg

1978

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Abteilung für Zytopathologie
(Leiter: Prof. Dr. P. Pfitzer)
des Pathologischen Institutes der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. W. Hort)

Messungen der DNA in den Zellkernen karzinomatöser
Ergüsse mit dem Durchflußzytrophotometer

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Sibylle Westenberger

1978



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Reinauer

Referent

gez.: Prof. Dr. Pfitzer

Korreferent

gez.: Prof. Dr. Schneider

Einleitung

Seit langem sind vom diploiden Normalbetrag abweichende DNA-Werte in malignen Tumoren bekannt (LEUCHTENBERGER et al., 1952, 1954; SANDRITTER, 1952). Umstritten ist jedoch der prozentuale Anteil der Tumoren mit pathologischem DNA-Gehalt (PFITZER und PAPE, 1973; ROHRBACH et al., 1973; BÖHM und SANDRITTER, 1975; KRUG, 1976; SANDRITTER, 1978).

Zwei Meßmethoden stehen für die Ermittlung der DNA-Werte zur Verfügung. Sie weisen unterschiedliche Vor- und Nachteile auf (Tab. I). Die Scanning-Mikroskopphotometrie ermöglicht einerseits eine Kontrolle von Morphologie und Kernstruktur der Zelle vor der Messung. Andererseits ist das Verfahren zeitraubend, und deshalb läßt sich nur eine sehr begrenzte Anzahl von Messungen in einem bestimmten Zeitraum durchführen. Die Messungen unterliegen darüber hinaus der subjektiven Auswahl der Kerne, und dabei werden erfahrungsgemäß Kerne von außergewöhnlicher Form oder Struktur häufiger gemessen als durchschnittlich strukturierte.

Die Impulszytophotometrie als zweite Methode der DNA-Bestimmung eignet sich zu Messungen einer großen Zahl von Zellkernen in kürzester Zeit. Eine Auswahl der Zellen entfällt. Nachteile ergeben sich jedoch daraus, daß die normalen Zellen des Stromas und des Blutes mitgemessen werden. Ferner muß eine ausreichende Menge an Zellen für diese Messungen vorhanden sein. Kleine Zellpopulationen mit verändertem DNA-Gehalt können bei einem hohen Anteil an normalen Zellen von diesen verdeckt werden und schwer fest-

Tab. I

	Impulszytrophotometer ICP Phywe	Scanning-Mikroskopphotometer SMP Zeiss/PDP 12
Vorteile:	Große Zahl an Messungen in kurzer Zeit Keine Selektion Quantitative Erfassung von Nekrosen	Morphologische Kontrolle Analyse der Kernstruktur
Nachteile:	Beimengung normaler Zellen Mindestmenge erforderlich Minoritäten werden überdeckt	Geringe Zahl an Messungen Kernanomalien bevorzugt

stellbar sein. Durch die Kombination beider Methoden werden ihre Schwächen ausgeglichen, und die Ergebnisse ergänzen sich (GORYSCH und PFITZER, 1975; PFITZER et al., 1978).

Für Messungen an karzinomatösen Ergüssen ist die Impulszytophotometrie ganz besonders geeignet. Das Material liegt bereits als Suspension mit meist hoher Zellzahl vor. Die Scanning-Mikroskopphotometrie kann dabei auf selektive Messungen mit geringem Zeitaufwand beschränkt werden.

Die klassischen Merkmale für Malignität bei der DNA-Messung umfassen eine vom diploiden 2C-Wert abweichende Stammlinie, vermehrte S-Phasen-Werte und eine verstärkte Streuung um die Gipfelachsen. Zusätzlich zeigen Tumorphistogramme häufig noch andere typische Zeichen der malignen Proliferation. Hier sind eine vergrößerte G_2 -Fraktion und einzelne hochpolyploide Werte zu nennen.

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, anhand von karzinomatösen Ergüssen den genauen Anteil der Tumoren zu ermitteln, die bei kombiniertem zytophotometrischem Vorgehen durch veränderte DNA-Werte zu erkennen sind. Ferner sollte die Übereinstimmung der beiden Meßverfahren überprüft werden.

Material und Methode

Die zytophotometrischen Messungen wurden an insgesamt 145 Punktaten karzinomatöser Ergüsse durchgeführt. Sie stammten von 131 Patienten und wurden der zytodiagnostischen Routine entnommen. Nach dem Sitz der Primärtumoren gliedert sich das Material wie folgt:

- 31 Mammakarzinome
- 29 Ovarialkarzinome
- 28 Bronchialkarzinome
- 17 Malignome des Verdauungstraktes
- 26 Tumoren anderen oder unbekannten Ursprungs.

15 Fälle aus einer früheren Untersuchung (GORYSCH und PFITZER, 1975) sind in die Auswertung miteinbezogen.

14 Patienten wurden mehrmals punktiert und diese Ergüsse somit als Wiederholung gemessen, nachdem jeweils vom selben Patienten schon Material bearbeitet worden war. Vier zusätzliche Fälle werden in dieser Darstellung nicht mehr berücksichtigt, da die Proben zum Zeitpunkt der Messung nur Zellschutt enthielten und demzufolge impulszytophotometrisch sogenannte Schmutzhyperbeln, also keine verwertbaren Resultate, ergaben.

Alle Proben wurden geteilt und für die beiden Meßmethoden unterschiedlich präpariert. Für die Impulszytophotometrie wurde das Punktionsmaterial zentrifugiert und das Sediment in absolutem Alkohol fixiert. Bis zur Messung konnte der Zellbestand dann gelagert werden. Die Vorbereitung zur Messung umfaßte eine einstündige Behandlung mit 0,1%iger RNase-Lösung bei 37 °C, nachdem das Material mit physio-

logischer Kochsalzlösung ausgewaschen worden war. Dieses Auswaschen erfolgte auch nach jedem weiteren Aufbereitungsschritt. Die Einwirkung von 0,5%igem Pepsin über 15 min bei 37 °C schloß sich an. Daraufhin wurden die Zellkerne 30 min bei Zimmertemperatur mit Ethidiumbromid gefärbt und anschließend mit Ultraschall behandelt, um Verklumpungen zu lösen. Die 20 sec dauernden Beschallungen wurden mit dem Ultraschall-Desintegrator der Firma Colora Meßtechnik bei einer Frequenz von 16 000 Hz durchgeführt. Zuletzt wurde die Suspension durch ein Netz mit 70 µ Maschenweite filtriert. Für die durchflußzytrophotometrischen Messungen fand das Impulszytrophotometer ICP 11 der Firma Phywe (ICP) Anwendung. Geeicht wurde das Gerät mit Hühnererythrozyten.

Als zweites Meßgerät wurde das Scanning-Mikroskopphotometer der Firma Carl Zeiss (SMP) zusammen mit dem Prozeßrechner PDP-12 der Firma Digital Equipment Corporation verwandt. Von den Proben waren dafür Ausstriche angefertigt und nach Feulgen gefärbt worden. Damit wurden zu jeder Probe selektive Messungen an einzelnen Tumorzellkernen durchgeführt. Fünf durchschnittlich große und fünf extrem große Kerne waren hierfür in der Regel ausreichend. Nur in einzelnen Fällen war es notwendig, zwischen 30 und 150 Zellkerne eines Typs zu messen. Mindestens fünf Lymphozyten lieferten den normalen DNA-Wert von 2C. Die Lymphozytenwerte wurden in den Histogrammen auf der Abszisse nach unten abgetragen. Die Absorptionsmessungen wurden bei einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt. Die Meßblende und die Schrittgröße betrugen jeweils 1/2 µ. Als Programm diente Apamos II. Im t-Test wurde die Signifikanz der SMP-Werte bei abweichenden Tumorzellwerten gesichert.

Ergebnisse

Die im Vordergrund des Interesses stehenden Histogramme der Impulszytrophotometrie (ICP) lassen sich entsprechend ihrer wichtigsten Merkmale zu verschiedenen Gruppen zusammenfassen.

Die stärkste Gruppe wird von den hyperdiploiden Tumoren gebildet (Tab. II). Sie liegen in 36 Fällen, entsprechend 27,5 % des Materials, vor und haben übereinstimmend positive ICP- und SMP-Histogramme. Der DNA-Gehalt hyperdiploider Tumoren kann soweit erhöht sein, daß ihre Stammlinie im Bereich der tri- bis tetraploiden Werte von Normalzellen oder noch darüber auftritt. Die typische DNA-Verteilung dieser Tumoren wird aus dem Histogramm eines Ovarialkarzinoms P. P. 71 ♀ ersichtlich (Abb. 1). Zuerst erscheint der schmale symmetrische Gipfel der Normalzellen, an den sich der Tumorgipfel mit annähernd gleicher Höhe anschließt. Er ist ebenfalls symmetrisch, jedoch deutlich breiter, und die ausladende Basis zeigt die verstärkte Streuung der Tumorwerte. Vermehrt sind auch die darauffolgenden Werte der Tumor-S-Phase, die bis zum dritten Gipfel reichen, der die G_2 -Fraktion des Tumors abbildet. Der Abstand Tumor- G_1 zu Tumor G_2 entspricht im Histogramm genau der Verdoppelung des DNA-Gehaltes. Ein klassisches Bild des hyperdiploiden Tumors zeigt auch das Histogramm eines weiteren Ovarialkarzinoms M. G. 48 ♀ (Abb. 2). Auf einen schmalen Normalgipfel folgt der vergrößerte und höhere Tumorgipfel und nach Tumor-S-Werten der flache G_2 -Gipfel. Die SMP-Werte des Tumors liegen ebenfalls erheblich über 2C und schließen einige hochpolyploide Kerne mit ein. Das dritte Ovarialkarzinom M. M. 60 ♀ (Abb. 3) läßt bei einem sehr schlanken

Tab. II

Lage der DNA-Stammlinien in 145 karzinomatösen Ergüssen von 131 Patienten.

DNA-Stammlinie des Tumors	>2C	Doppel- gipfel	<2C	überlagert mit 2C	~ 2C	ICP- SMP+	ICP+ SMP-
Mamma- karzinome (N = 31)	12 (1)	7	-	1	9	2	-
Ovarial- karzinome (N = 29)	10 (3-)	4	1 (1-)	2	10	1	1
Bronchial- karzinome (N = 28)	10	3 (1-)	-	1	11 (1)	3	-
Intestinal- karzinome (N = 17=)	-	3	-	1	9 (4)	4	-
Sonstige (N = 26)	4	2 (1)	2	2	9 (1)	7 (1)	-
n = 131	36	19	3	7	48	17	1
100 %	27,5	14,5	2,3	5,3	36,6	13,0	0,8

() Wiederholung der Punktion

(-) negativer Befund

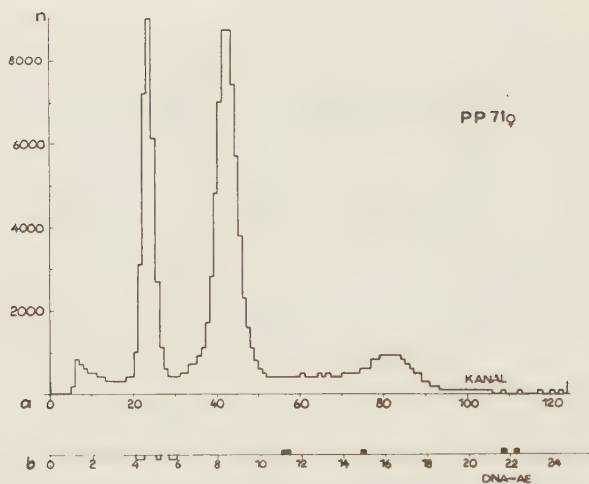


Abb. 1 a Typisches ICP-Histogramm eines hyperdiploiden Ovarialkarzinoms mit schmalen Normalgipfel, Tumor-G₁ und Tumor-G₂.

b Scanningwerte. Diploide Kontrollwerte weiß nach unten eingezeichnet.

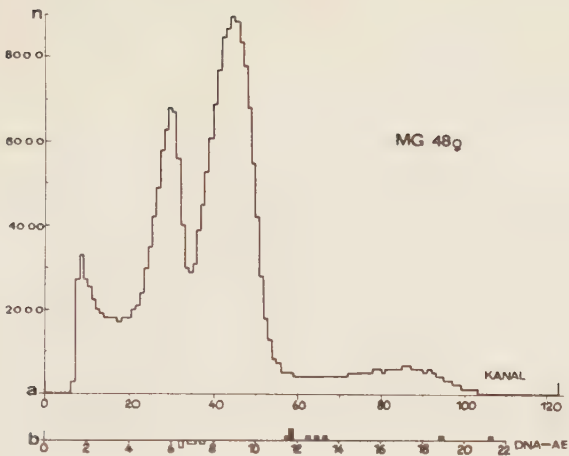


Abb. 2 a Hyperdiploides Ovarialkarzinom. Tumorgipfel höher und breiter als der Normalgipfel, Tumor- G_2 flach.
 b SMP-Histogramm mit hochpolyploiden Werten.

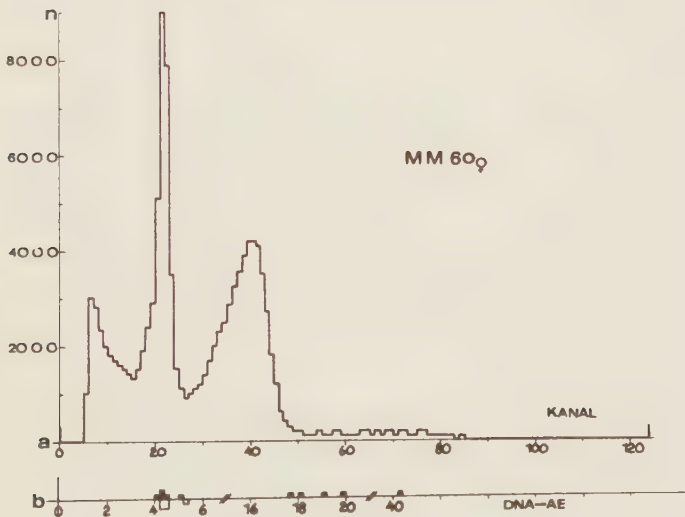


Abb. 3 a-b ICP- und SMP-Histogramm eines Ovarialkarzinoms. Die Tumorwerte überlagern die gesamte Breite des Normalgipfels.

Normalgipfel und dem breiten, nur etwa halb so hohen Tumorgipfel die Überlagerung der Normalwerte durch die Tumorzellen erkennen. Verlängert man den Tumorgipfel links an seiner Basis, erkennt man, daß die Tumorwerte die gesamte Breite des Normalgipfels überlagern, und dies wird durch die Kontrollmessungen mit dem SMP bestätigt. Auch nach rechts, bis zu stark erhöhten Werten, erstrecken sich noch Tumorzellen. Typisch ist weiterhin das Histogramm eines Mammakarzinoms G. K. 46 ♀ (Abb. 4). Die Tumorzellen erscheinen hier als kleiner zusätzlicher Gipfel im triploiden Bereich. Die unterschiedliche Höhe der Tumorgipfel in den genannten Abbildungen ist auf einen wechselnden Gehalt an Tumorzellen in den Suspensionen zurückzuführen. Das Punktat des Mammakarzinoms enthält dabei den geringsten Anteil an Tumorzellen, während in den Ovarialkarzinomen von Abb. 1 und 2 die pathologischen Zellen überwiegen. Ein weiteres Histogramm mit geringem Anteil an Tumorzellen liegt von einem Bronchialkarzinom H. D. 70 ♂ (Abb. 5a) vor. Zu sehen sind der Normalgipfel und im Abstand von 31 Kanälen der Tumorgipfel, außerdem einige Werte der Tumor- G_2 . Zwischenwerte des Tumors sind hierbei nicht abgebildet. Um ein genaueres Profil der Tumorwerte zu erhalten, kann man die 2C-Werte bei der Messung ausblenden. Das resultierende Histogramm (Abb. 5b) zeigt in üblicher Weise die Tumor- G_1 in einem breiten Gipfel, eine vermehrte Anzahl von S-Phasen-Kernen und den deutlichen G_2 -Gipfel.

Neben dem Verhältnis von Tumor- zu Normalzellen ist auch der Abstand zwischen Normal- und Tumorgipfel veränderlich. In Abhängigkeit vom DNA-Wert der Tumorstammlinie beträgt die Distanz zwischen 2C und Tumor- G_1 im Fall des Ovarial-

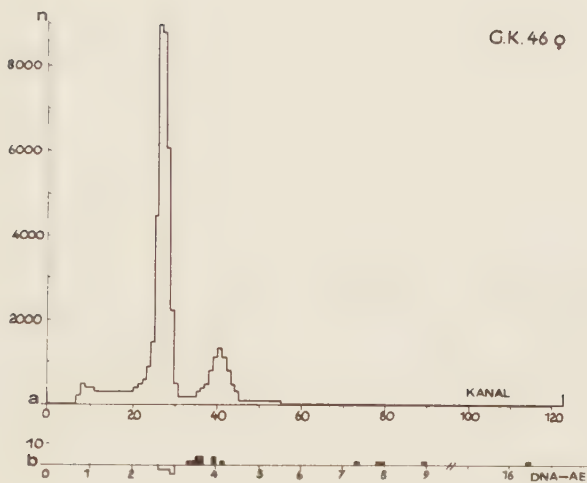


Abb. 4 a-b ICP- und SMP-Histogramm eines Mammakarzinoms.
Kleiner Tumoranteil.

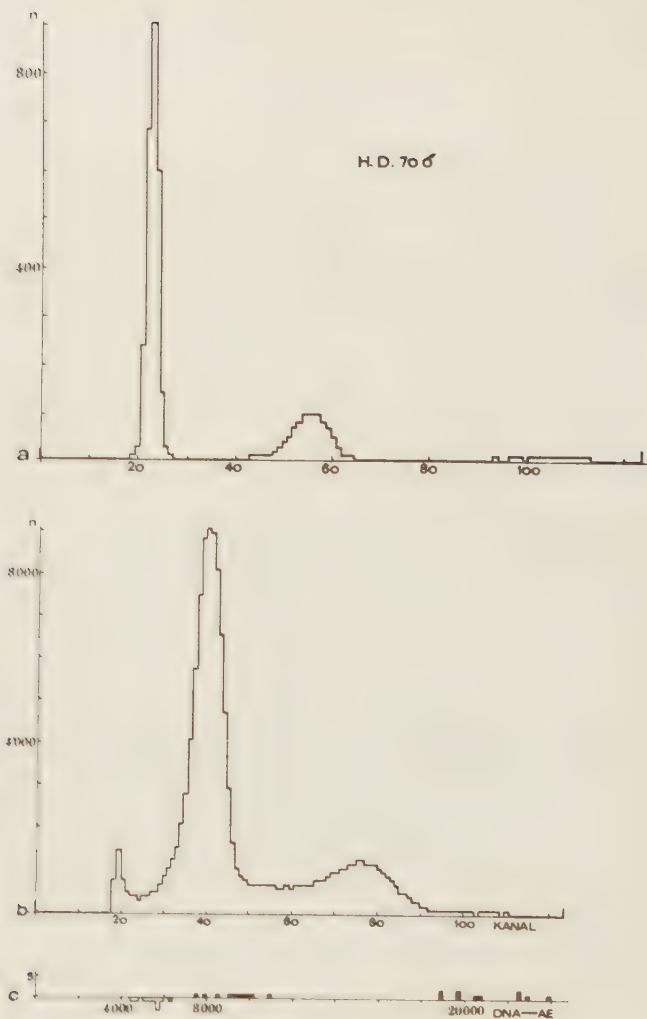


Abb. 5 a ICP-Histogramm eines Bronchialkarzinoms.
 Schlanker Normalgipfel, kleiner Tumorgipfel.
 b Nach Ausblenden der 2C-Werte Anreicherung der
 Tumor-G₁, S-Phase und Tumor-G₂.
 c SMP-Histogramm.

karzinoms P. P. 71 ♀ (Abb. 1) 18 Kanäle und im Fall des Ovarialkarzinoms M. G. 48 ♀ (Abb. 2) nur 13 Kanäle.

Rücken die aneuploiden Tumorwerte noch näher an 2C, kommt es zuerst zu einer stärkeren Überlagerung der normalen durch die pathologischen Zellen. Bei nur geringer Differenz der DNA-Werte entsteht entweder ein Doppelgipfel, oder das Histogramm ergibt einen verbreiterten gemeinsamen Gipfel. Histogramme mit Doppelgipfeln bilden die zweite Kolonne der Tabelle II und haben bei diesen Messungen einen Anteil von 14,5 % (19 Fälle). Einen Gipfel mit gedoppelter Spitze zeigt ein Mammakarzinom E. D. 65 ♀ (Abb. 6). Der erste Gipfel entspricht wiederum den Normalzellen, der Zweitgipfel den Tumorzellen. Belegt wird das Vorliegen eines Doppelgipfels durch die SMP-Messung, die für die Stammlinien signifikant unterschiedliche DNA-Werte ergibt ($p < 0,001$). Es sind jedoch auch Fälle in unserem Material, die zwar einen signifikanten Unterschied der SMP-Werte aufweisen, ohne jedoch einen Doppelgipfel im ICP-Histogramm auszubilden. Dieses ICP-Histogramm eines Mammakarzinoms S. P. 48 ♀ (Abb. 7) ist ohne pathologische Merkmale bei zwei verschiedenen Stammlinien im SMP-Histogramm ($p < 0,005$). Die Kurve gehört deswegen zur Gruppe der ICP-negativen und SMP-positiven Histogramme (Tab. II).

Eine Abweichung der Tumor-DNA ist jedoch nicht nur zu höheren Werten hin möglich. Das vorliegende Material enthält drei hypodiploide Tumoren (2,3 %; Tab. II). Die SMP-Messungen ergeben jeweils signifikant erniedrigte Tumorwerte ($p < 0,001$). Bei den ICP-Messungen resultieren unterschiedliche Histogramme. Im Fall eines Ovarialkarzinoms G. W. 56 ♀ (Abb. 8) stammt der erste breite Gipfel von den

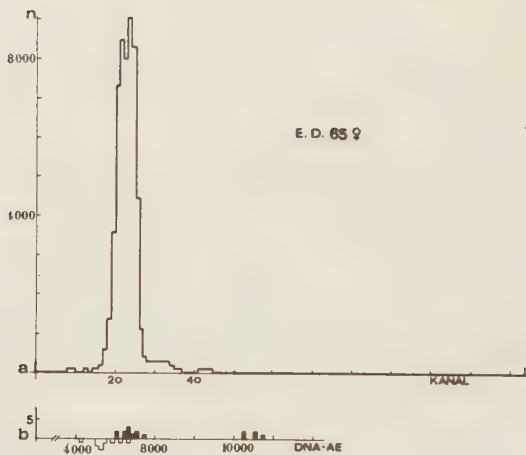


Abb. 6 a ICP-Histogramm eines Mammakarzinoms mit Doppelgipfel.

b SMP-Histogramm zeigt signifikanten Unterschied mit $p < 0,001$.

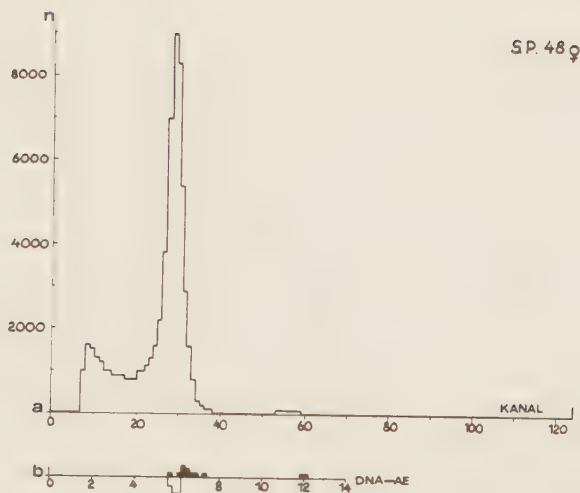


Abb. 7 a ICP-Histogramm eines Mammakarzinoms ohne pathologische Merkmale der DNA-Menge.

b SMP-Histogramm zeigt signifikant zwei Stamm-
linien ($p < 0,005$).

Tumorzellen. Dann folgt der schlanke Gipfel der Normalzellen. Der Fall eines Ergusses bei unbekanntem Primärtumor unterscheidet sich lediglich durch einen geringeren Anteil an Normalzellen, also ein sehr kleines, wenig von der Tumor- G_1 abgesetztes Maximum. Im früher bereits veröffentlichten Fall eines Mesothelioms L. M. 59 ♀ (GORYSCH und PFITZER, 1975; Abb. 5a, b) wird im ICP-Histogramm nach dem Zellschutt nur ein kleiner Vorgipfel sichtbar (Abb. 9). Dann folgt ein Hauptgipfel, der links, und vor allem rechts, an der Basis treppenförmig abfällt. Die SMP-Messungen zeigen die G_1 - und G_2 -Phase eines hypodiploiden Tumors und dazwischen den Wert der Lymphozyten. Dementsprechend muß also der kleine Gipfel die G_1 des Tumors darstellen, während der Hauptgipfel von den zahlreich vorhandenen Lymphozyten stammt. An dem treppenförmigen Abfall läßt sich noch erkennen, daß die Tumor- G_2 von den Lymphozyten überlagert wird. Im SMP lassen sich auch einige hochpolyploide Tumorkerne nachweisen, deren prozentualer Anteil jedoch zu gering ist, um im ICP-Histogramm in Erscheinung zu treten.

Als zweite Möglichkeit der Gipfelumformung bei einem Tumor-DNA-Gehalt von nahe 2C wurde bereits der durch überlagernde Tumorzellen verbreiterte 2C-Gipfel erwähnt. In 7 Fällen oder 5,3 % bestehen eindeutig überlagerte 2C-Kurven (Tab. II). Das Histogramm eines Ovarialkarzinoms H. H. 60 ♀ (Abb. 10) besitzt auf beiden Seiten des 2C-Maximums asymmetrische Vorsprünge und läuft bis in mehrfach polyploide Werte aus. Die Überlagerung von zwei Zellpopulationen führt jedoch nicht immer zu asymmetrischen Gipfeln. Ähnlich wie im Falle des Ovarialkarzinoms H. H. 60 ♀ (Abb. 10) liegt auch bei einem Mammakarzinom M. R. 43 ♀ (Abb. 11a) ein Gipfel vor,

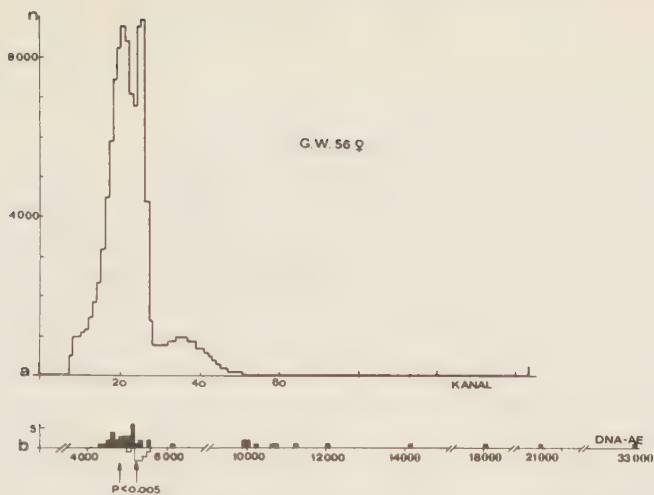


Abb. 8 a ICP-Histogramm eines hypodiploiden Ovarialkarzinoms. Der erste breite Gipfel stammt von den Tumorzellen. Der schmale Normalgipfel schließt sich an.

b Im SMP-Histogramm liegen die Tumorwerte signifikant unter den Normalwerten ($p < 0,005$).

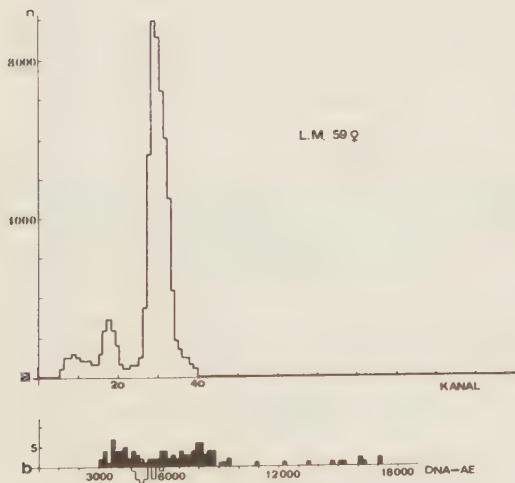


Abb. 9 a ICP-Histogramm eines hypodiploiden Mesothelioms. Der kleine Vorgipfel stammt von der Tumor- G_1 . Den Hauptgipfel stellen die Lymphozyten, die

ihrerseits die Tumor-G₂ verdecken, nur erkenntlich an der treppenförmigen Basis.

- b Das SMP-Histogramm ermöglicht in diesem Fall erst die Interpretation der ICP-Messung. G₁- und G₂-Phase des hypodiploiden Tumors, dazwischen der Lymphozytenwert.

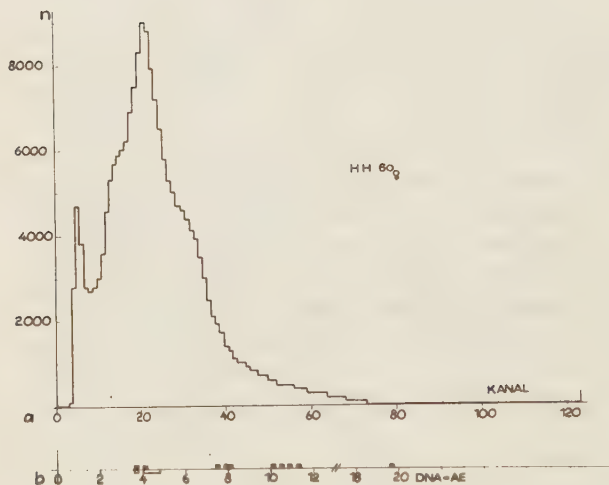


Abb.10 a-b ICP- und SMP-Histogramm eines Ovarialkarzinoms. Auf beiden Seiten des 2C-Maximums asymmetrische Vorsprünge durch die überlagernden Tumorzellen.

der rechts eine Verbreiterung aufweist und links verstärkt treppenförmig abfällt, wobei vermutlich die Normalzellen die Spitze bilden und aus den breiter verteilten Tumorzellen herausragen. Bei einer Wiederholungsmessung des Ergusses nach einem Tag (Abb. 11c) ist jedoch die Asymmetrie ausgeglichen. Der Gipfel erscheint nahezu gleichförmig. Das Plateau der S-Phase steigt gering an. Besondere Erwähnung verdient an dieser Stelle der Fall eines hyperdiploiden Mammakarzinoms E. S. 50 ♀ (Abb. 12a-e). Das ICP-Histogramm (Abb. 12a) weist zuerst im Anschluß an den Schuttanteil den Hauptgipfel aus Normalzellen auf. Dann folgt ein Tumornebengipfel, der jedoch nicht direkt abfällt, sondern erst ein breites Plateau bildet, um dann treppenförmig abzuschließen. Auch bei der G_2 -Fraktion des Tumors sind ein Gipfel und ein anschließendes Plateau zu erkennen. Im SMP-Histogramm, das die große Zahl der Meßwerte dieses Falles zusammenfaßt (Abb. 12b), sind in der Tumor- G_1 , die zwischen 4 - 7 relativen Absorptionseinheiten (AE) liegt, ebenfalls zwei Gipfel abzugrenzen. Die Werte der Tumor- G_2 befinden sich etwa bei 11 - 12 AE und sind auch zweigipflig. Sogar die Fraktion der Tumorzellen mit abermals verdoppeltem DNA-Gehalt bei 20 - 26 AE ist zweigeteilt. Diese Konfiguration legt den Verdacht auf einen Tumor mit zwei Stammlinien nahe. In diesem Fall müßten sich die einzelnen Zellverbände des Ergusses im SMP-Ausstrich anhand ihres DNA-Wertes jeweils einer der beiden Stammlinien zuordnen lassen. Zur Klärung dieser Frage liegen SMP-Messungen von zwölf Zellverbänden vor, in denen jeweils mindestens 10 Kerne gemessen werden konnten. Drei der zwölf Histogramme sind als Beispiele abgebildet (Abb. 12c-e). Ein Hinweis auf zwei getrennte Stammlinien läßt sich jedoch nicht finden. Alle zwölf Histogramme

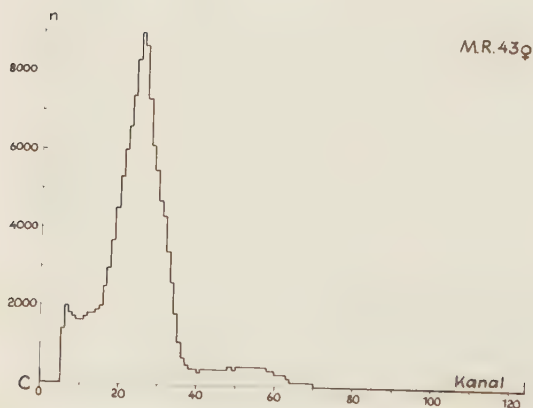
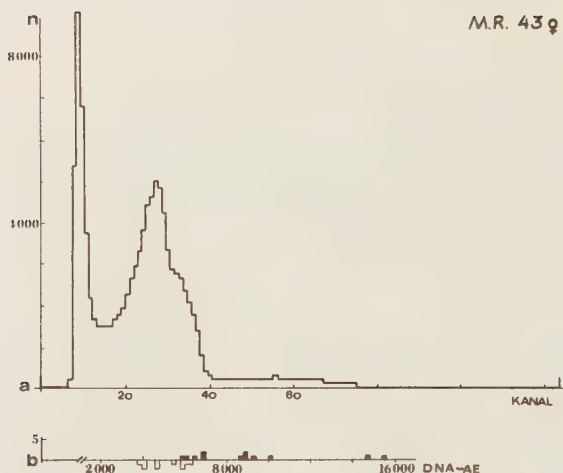
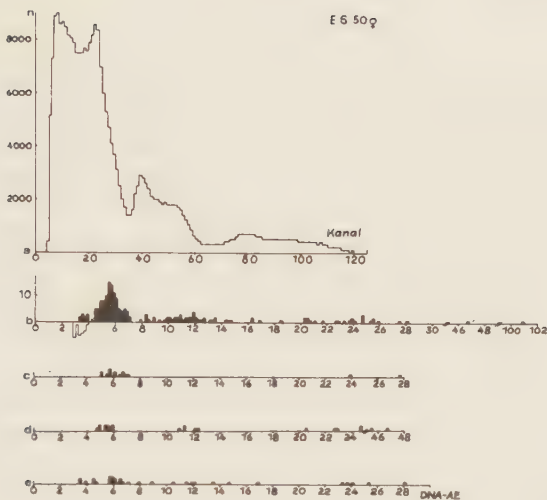


Abb.11 a-b ICP- und SMP-Histogramm eines Mammakarzinoms. Ungleichmäßig überlagerter 2C-Gipfel mit Verbreiterung der rechten Seite.

c Zweite Messung des Ergusses einen Tag später. Der deutlich verbreiterte 2C-Gipfel zeigt keine Asymmetrie mehr.



- Abb. 12 a ICP-Histogramm eines hyperdiploiden Mamma-karzinoms zeigt Schuttanteil, Normalgipfel, Tumorgipfel und anschließendes Plateau, dann Tumor- G_2 , ebenfalls mit Plateau.
- b Gesamthistogramm der SMP-Messungen läßt ebenfalls bei Tumor- G_1 und - G_2 und weiterem Verdoppelungsschritt jeweils zwei angedeutete Maxima erkennen.
- c Einzelner Zellverband mit geringer Polyploidie.
- d Zellverband mit hochpolyploiden Kernen.
- e Zellverband mit breiter Streuung.

weisen Werte im Bereich von 4 - 7 AE und - bis auf zwei Ausnahmen - auch Kerne um 12 AE auf. Außerdem sind in 10 der Zellgrüppchen Kerne mit Werten um oder über 20 AE vorhanden. Die Verteilung der Zellverbände entspricht somit im wesentlichen dem Gesamthistogramm (Abb. 12 b). Unterschiedlich ist jedoch der Polyploidiegrad der einzelnen Zellgruppen. Das erste Einzelhistogramm (Abb. 12c) umfaßt 15 Werte, von denen 13 zwischen 5 - 7 AE liegen. Nur zwei liegen beim etwa vierfachen Wert der Tumor- G_1 von 24 bzw. 28 AE. Einige Zellkerne weisen also eine Polyploidie auf. Die nächste Gruppe besteht aus 22 Zellen (Abb. 12d) mit zum Teil hochpolyploiden Kernen mit achtfachen Werten der Tumor- G_1 . Mit 12, 24 und 46 AE sind drei Verdoppelungsschritte des G_1 -DNA-Gehaltes vorhanden. Der dritte abgebildete Verband von 32 Zellen (Abb. 12e) zeigt dagegen eine breite Streuung mit Werten zwischen 3 und 17 sowie zwischen 23 und 28 AE. Die anderen neun Einzelhistogramme entsprechen den dargestellten Beispielen. Ein Nachweis zweier Stammlinien ist anhand dieser Werte somit nicht möglich. Die Erklärung bietet die Krankengeschichte der Patientin. Zur Zeit der Punktion wurde nämlich eine intensive zytostatische Therapie betrieben, und die gemessenen Werte spiegeln den Synchronisationseffekt auf die Tumorzellen, nicht aber eine zweite Stammlinie, wider.

Zusammengefaßt stellen sich die Ergebnisse folgendermaßen dar (Tab. II). Sowohl im ICP- als auch im SMP-Histogramm sind 49,6 % dieses Untersuchungsmaterials tumorspezifisch. Mit einem weiteren Fall, der nur im ICP-Histogramm eine von 2C abweichende Stammlinie aufweist, sind 50,4 % der Messungen ICP-positiv. Im ICP-Histogramm ohne patholo-

gische Merkmale, jedoch SMP-positiv, sind weitere 13 % der Fälle, so daß mit beiden Verfahren 62,6 % des Materials als tumorverdächtig erkannt werden können.

Zur Quantifizierung der Unterschiede zwischen den Messungen beider Systeme waren bei neun aneuploiden Tumoren Vergleiche über den Abstand zwischen 2C-Wert und Tumor-G₁-Gipfel jeweils im ICP- und im SMP-Histogramm möglich (Tab. III). Dabei ist bei sieben Fällen eine gute Übereinstimmung festzustellen. Die Abstände im ICP-Histogramm weichen bei ihnen nur um 1 bis höchstens 13 % von den im SMP-Histogramm ermittelten ab. Unterschiede dieser Größenordnung dürften sich auf technische Bedingungen zurückführen lassen. Bei zwei Fällen ergibt sich allerdings eine deutliche Diskrepanz. In einem Fall ist der Abstand 2C zu Tumor-G₁ im ICP-Histogramm um 52 % geringer, im anderen Fall um 75 % größer als im dazugehörigen SMP-Histogramm. Die Ursache dürfte in Unterschieden der Anfärbbbarkeit zu suchen sein, die gegebenenfalls durch strukturelle Verschiedenheiten bedingt sein könnten.

Tab. III

Abstand zwischen 2C und Tumor-G₁ in Prozent des 2C-Wertes bei neun aneuploiden Tumoren. Übereinstimmung von oben nach unten abnehmend. Differenz $\triangle$, ICP-Werte bezogen auf SMP-Werte.

	<u>ICP-Histogramm</u>	<u>SMP-Histogramm</u>	<u>$\triangle$</u>
A. P. 79	122	121	+ 1
A. M. 61	28	25	+ 3
M. H. 44	15	21	- 6
G. W. 56 (Abb. 8)	15	7	+ 8
C. S. 64	45	53	- 8
E. S. 50 (Abb. 12)	77	68	+ 9
E. D. 65 (Abb. 6)	10	23	- 13
C. M. 61	20	72	- 52
H. S. 43	109	34	+ 75

Diskussion

Die vorliegende Untersuchung schließt an verschiedene Arbeiten an, in denen versucht wurde, in DNA-Histogrammen charakteristische Merkmale für die Identifizierung von Tumorzellen zu finden (PFITZER und PAPE, 1973; COELHO und PFITZER, 1974; GORYSCH und PFITZER, 1975; MOUBAYED, 1976; PFITZER und PAPE, 1975; PAPE et al., 1976; PFITZER, 1977).

Für die Durchführung der Messungen wurde wiederum die Kombination der beiden heute zur Verfügung stehenden grundsätzlich verschiedenen zytophotometrischen Verfahren eingesetzt, nämlich die selektive Einzelmessung mit dem Scanning-Zytophotometer und die nichtselektive rasche Messung einer großen Anzahl von Zellen mit dem Durchflußzytophotometer ICP (GORYSCH und PFITZER, 1975). Die Kombination der beiden Meßverfahren bietet die Möglichkeit, die Vorteile beider Systeme zu kombinieren und ihre jeweiligen Nachteile zu vermeiden (PFITZER et al., 1978). Für Untersuchungen mit dem Durchflußzytophotometer sind karzinomatöse Ergüsse besonders geeignet, da ihre Präparation nur geringe Probleme mit sich bringt. Im Gegensatz zu flüssigen experimentellen Tumoren (GÖHDE, 1973) handelt es sich bei den hier untersuchten Proben um Routinematerial aus der täglichen Diagnostik eines zytopathologischen Labors, das sich insbesondere insofern von experimentellen Tumoren unterscheidet, als es neben den Tumorzellen in unterschiedlicher Anzahl normale Zellen aus dem Blut und Mesothel enthält. Dies stellt an die Analyse der DNA-Histogramme besondere Anforderungen und gehört zu dem Problemkreis einer patientennahen Tumorforschung.

Die registrierten DNA-Histogramme lassen sich zu verschiedenen Gruppen zusammenfassen. Den größten Anteil stellen dabei die klassischen hyperdiploiden Histogramme mit 27,5 % des Materials. Ebenfalls zu den hyperdiploiden Tumoren gehören diejenigen mit Doppelgipfeln, ein Typ, der in Ergüssen häufiger gefunden wird als in festem Material (SCHALBRUCH, 1978). Verbreiterte Gipfel im Bereich des diploiden 2C-Wertes entsprechen ebenfalls aneuploiden Tumoren und sind als solche erkennbar. Vereinzelt wurden in den Ergüssen auch hypodiploide Histogramme registriert. Im Material unseres Arbeitskreises (PFITZER et al., 1978) ist dieser Typ mit dem Durchflußzytophotometer nur in Ergüssen nachgewiesen worden. In der Literatur liegen bisher nur einzelne Mitteilungen über hypodiploide Tumoren vor, die jedoch alle lediglich durch eine kleine Anzahl von scanning-zytophotometrischen Messungen belegt sind (LUDWIG et al., 1973).

Der relativ niedere Anteil von insgesamt 50,4 % aneuploiden Tumoren in unseren Untersuchungen steht im Widerspruch zu den Angaben von BÖHM und SANDRITTER (1975) und SANDRITTER (1978), die mit dem Scanning-Verfahren 96 % aneuploide Tumoren nachgewiesen haben. Von dieser Angabe wichen allerdings eine größere Anzahl von Autoren deutlich ab. So wurden bei einigen sehr kleinen Kollektiven zwar etwa 90 % aneuploide Tumoren gefunden (PFITZER und PAPE, 1973; ROHRBACH et al., 1973), für Mammatumoren wird jedoch nur mit etwa 2/3 aneuploiden Tumoren gerechnet (PROP und MEIJER, 1978), wobei einzelne Autoren einen noch geringeren Prozentsatz angeben (BOQUOI et al., 1975). Die einzige Angabe, die sich auf Messungen mit dem Durchflußzytophotometer stützt, stammt von SCHUMANN und Mitarbeitern (1978). Hierbei handelt es

sich um eine Gruppe von 101 malignen Melanomen, Plattenepithelkarzinomen der Haut, Teratomen, Prostatakarzinomen und Sarkomen. Das Ergebnis von 60 % aneuploiden Tumoren weicht nur um 10 % vom Resultat der vorliegenden Arbeit ab, wobei der Unterschied auf der verschiedenen Zusammensetzung des untersuchten Materials beruhen könnte.

Auffallend sind die sehr unterschiedlichen Ergebnisse, die mit der Scanning-Zytophotometrie erzielt wurden. Ein Teil erklärt sich aus der jeweils recht geringen Zahl von einigen Hundert Messungen pro Histogramm, ein weiterer durch die unterschiedlichen Kriterien der Beurteilung, die sich in einigen Fällen auf Durchschnittswerte aller Messungen bezieht und dabei die Gesichtspunkte der Zellkinetik außer acht läßt. Andere Autoren vergleichen das erste Maximum des Tumorchistogramms mit diploiden oder haploiden Testzellen. Hierbei war seit langem bekannt, daß der diploide DNA-Wert von Lymphozyten von 2C abweichen kann (HALE und WILSON, 1961; HALE, 1963). Neuere Untersuchungen an Tumoren der Mundschleimhaut ergaben, daß die Lymphozytenwerte unter dem Einfluß der Therapie Veränderungen aufweisen können (FRIESS, 1978). Hierbei dürfte es sich um Änderungen im Zusammenhang mit der immunologischen Lymphozytenaktivität handeln. Einige der abweichenden Werte im Tumorchistogramm beruhen somit vermutlich auf Änderungen des Bezugssystems und nicht auf Änderungen des DNA-Gehaltes in den Tumorzellen. Darüber hinaus führt die begrenzte Zahl der SMP-Messungen dazu, daß bei starker Streuung der Werte die Abgrenzung des ersten Maximums häufig recht willkürlich erfolgen muß. Die Übereinstimmung oder Abweichung vom Bezugswert wird damit zwangsläufig fragwürdig. Ob sich alle Differenzen zwischen den Ergebnissen beider Methoden durch

diese verschiedenen Ursachen erklären lassen, ist fraglich, da man sich für die beiden Meß-Systeme darüber hinaus unterschiedlicher Färbungen bedient. Beim Scanning-Zytophotometer wird die Feulgenreaktion eingesetzt, während es sich bei der Durchflußzytophotometrie um eine Fluorochromierung der Zellkerne handelt. Diese unterschiedlichen Färbeverfahren könnten ebenfalls einen Teil der divergierenden Ergebnisse erklären. So sind auch in den vorliegenden Untersuchungen 13 % der Tumoren im Durchflußzytophotometer negativ, während die Scanning-Messungen positive Werte ergaben.

Lassen sich aus den vorliegenden Untersuchungen weitere Probleme erkennen, die speziell für die Durchflußzytophotometrie bestehen? Einen Hinweis liefern die Wiederholungsmessungen, bei denen in 14 Fällen jeweils das Material einer zweiten Punktion ebenfalls untersucht wurde. Ihre Ergebnisse sind auffallend uneinheitlich. Es finden sich darunter allein 5 Fälle, die negativ verliefen, also einen zuerst positiven Befund nicht bestätigten. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten der Erklärung. Einmal kann der Anteil der Tumorzellen als Folge der Entnahmetechnik oder einer zwischenzeitlich durchgeführten Therapie abgenommen haben. Als Beispiel kann der Fall dienen, in welchem bei der Wiederholungsmessung ein hypodiploider, also verminderter DNA-Wert registriert wurde, der durch eine Schädigung der Zellen bedingt sein dürfte.

Seit den ersten vergleichenden Messungen (GORYSCH und PFITZER, 1975) ist bekannt, daß die Färbung mit dem Fluorochrom Ethidiumbromid von äußeren Faktoren, wie der Lagerungsdauer des Materials, seiner Fixierung und anderem abhängen

kann. In diesem Zusammenhang ist auch das Ergebnis der Wiederholungsmessung eines der Mammakarzinome (M. R. 43 q, Abb. 11) zu sehen, bei dem sich die asymmetrische Kurve in eine symmetrische, wenn auch sehr breite Überlagerungskurve verändert hatte. Die Unterschiede im Färbungsvorgang zwischen der Feulgenreaktion und der Fluorochromierung für das ICP werden quantifizierbar, wenn man bei hyperdiploiden Tumoren die Abstände zwischen dem diploiden 2C-Gipfel und der hyperdiploiden Tumor-G₁-Fraktion in beiden Histogrammen vergleicht. Die Tatsache, daß bei einigen Tumoren extreme Differenzen gefunden werden, spricht für die Bedeutung noch unbekannter struktureller Unterschiede in den Zellkernen für die Färbung und damit für die Meßergebnisse.

Zum augenblicklichen Stand der DNA-Zytophotometrie kann abschließend gesagt werden, daß die Methoden der selektiven Scanning-Zytophotometrie und der nichtselektiven Durchflußzytophotometrie bei richtiger Anwendung ein interessantes Instrumentarium für die Forschung darstellen. Ihr Einsatz in der praktischen Diagnostik ist jedoch vorerst noch begrenzt durch einen recht hohen Prozentsatz falsch negativer Resultate. Dies verringert jedoch nicht den Wert der positiven Befunde. Weitere Erkenntnisse über die Biologie maligner Tumoren dürften hier in Zukunft neue Möglichkeiten eröffnen.

Zusammenfassung

Untersucht wurden 145 karzinomatöse Ergüsse aus der zyto-diagnostischen Routine; die von 131 Patienten stammten. Die Messungen wurden mit dem nichtselektiven Impulszytophotometer durchgeführt. Mit dem Scanning-Mikroskopphotometer wurden außerdem jeweils selektive Kontrollwerte dazu ermittelt.

50,4 % der Fälle erwiesen sich dabei als tumorspezifisch im ICP-Histogramm. Sie ließen sich in verschiedene Gruppen einteilen. 36 % aller gemessenen Fälle zeigten eine deutlich abgegrenzte Stammlinie über 2C. 14,5 % wiesen einen Doppelgipfel auf. In 2,3 % des Materials lagen hypodiploide Tumoren vor. Und in 5,3 % ließ ein grob verbreiteter 2C-Gipfel die Tumorzellen erkennen. Weitere 13 % ergaben nur im SMP-Verfahren eine von 2C abweichende Stammlinie, so daß bei Kombination beider Systeme 62,6 % der Fälle als tumorverdächtig eingestuft werden konnten.

Bei einem Vergleich der Abstände zwischen 2C- und Tumorgipfel im ICP- und SMP-Histogramm zeigten zwei Fälle hochgradige Abweichungen, deren Ursache unbekannt ist.

Durch die Ergebnisse wird deutlich, daß der Einsatz des Durchflußzytophotometers in der praktischen Diagnostik zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur eingeschränkt möglich ist und vorwiegend in der Grundlagenforschung sinnvoll sein dürfte.

Literatur

BÖHM, N. and SANDRITTER, W.:

DNA in human tumors: A cytophotometric study.
Curr. Topics in Pathology 60, 151 - 219 (1975)

BOQUOI, E., KREBS, S. and KREUZER, G.:

Feulgen-DNA-cytophotometry on mammary tumor
cells from aspiration biopsy smears.
Acta Cytol. 19, 326 - 329 (1975)

COELHO, C. P. und PFITZER, P.:

Zytophotometrische Bestimmung des DNS-Gehaltes
von Zellkernen verschiedener Tumoren und ihrer
Metastasen.
Arch. Geschwulstforsch. 43, 217 - 238 (1974)

FRIESS, W.:

Der Einfluß von Strahlen und Zytostatika auf den
Gehalt an DNS in den Kernen von Tumorzellen und
Lymphozyten.
Diss. Köln, 1978

GÖHDE, W.:

Automation of cytofluorometry by use of the impuls-
cytophotometer.
in: THAER, A. A. and SERNETZ, M.: Fluorescence
techniques in cell biology.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1973

GORYSCH, H. und PFITZER, P.:

Vergleichende Messungen an Ergüssen mit dem Impuls-
cytophotometer und dem Scanning-Mikroskopphotometer.
in: ANDREEF, M.: Impulszytophotometrie.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1975

HALE, A. J.:

The leucocyte as a possible exception to the theory of DNA constancy.

J. Path. Bact. 85, 311 - 326 (1963)

HALE, A. J. and WILSON, S. J.:

The DNA content of the leucocytes in human blood, bone marrow and lymph glands.

J. Path. Bact. 82, 483 - 501 (1961)

KRUG, H.:

Impulszytrophotometrische Untersuchungen an Tumormaterial.

Arch. Geschwulstforsch. 110 - 115 (1976)

LEUCHTENBERGER, C., KLEIN, G. and KLEIN, E.:

The estimation of nucleic acids in individually isolated nuclei of ascites tumors by ultraviolet microspectrophotometry and its comparison with the chemical analysis.

Cancer Research 12, 480 - 483 (1952)

LEUCHTENBERGER, C., LEUCHTENBERGER, R. and DAVIS, A. M.:

A microphotometric study of the desoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues.

Amer. J. Path. 30, 65 - 85 (1954)

LUDWIG, A. S., OKAGAKI, T., RICHART, R. M. and LATTES, R.:

Nuclear DNA content of lobular carcinoma in situ of the breast.

Cancer 31, 1553 - 1560 (1973)

MOUBAYED, A. P.:

Zytomorphologische, zytophotometrische und histologische Diagnostik an Mammabiopsien.

Geburtsh. Frauenheilk. 36, 905 - 911 (1976)

PAPE, H. D., PFITZER, P. und SJEROBABIN, I.:

Die Charakterisierung von Zellpopulationen maligner Mundschleimhauttumoren und Metastasen durch DNS-Messungen.

Dtsch. zahnärztl. Z. 31, 65 - 68 (1976)

PFITZER, P.:

Analysis of tumor cell populations by DNA cytophotometry.

Proc. Third Internat. Symp. Detection Prevention of Cancer. Marcel Dekker. New York 1977

PFITZER, P. and PAPE, H. D.:

Characterization of tumor cell population by DNA measurements.

Acta Cytol. 17, 19 - 26 (1973)

PFITZER, P. and PAPE, H. D.:

Investigation of DNA-content of leukoplakia cells of oral mucosa.

J. Maxillofacial Surg. 3, 119 - 124 (1975)

PFITZER, P., KREIDLER, J., WESTENBERGER, S. and SCHALBRUCH, R.:

Concordance and discrepancy between Pulse- and Scanning-Cytophotometry of Nuclear DNA.

in: LUTZ, D.: Pulse-Cytophotometry.

European Press, Ghent 1978, 431 - 445

PROP, F. J. A. and MEIJER, J.:

Human mammary carcinoma in vitro. Effects of
cytostatic drugs.

European Tissue Culture Society, Glasgow 1978

ROHRBACH, R., EPKE, E., SCHMIDT, H. und SANDRITTER, W.:

Zytophotometrische Messungen des DNS- und Histon-
proteingehaltes von Pleuraexsudatzellen bei malignen
und entzündlichen Prozessen.

Verh. dtsch. Ges. Path. 57, 186 - 195 (1973)

SANDRITTER, W.:

Über den Nukleinsäuregehalt in verschiedenen
Tumoren.

Frkfr. J. Path. 63, 423 - 446 (1952)

SANDRITTER, W.:

Cytophotometrische Methoden zur Abgrenzung normaler
und maligner Zellen.

Verh. Deutsch. Krebsgesellschaft, im Druck (1978)

SCHALBRUCH, R.:

DNA-Cytophotometrie solider Tumoren.

Diss. Düsseldorf, 1978

SCHUMANN, J., GÖHDE, W. and ZANTE, J.:

Aneuploidies in solid human tumors.

in: LUTZ, D.: Internat. Symp. Pulse-Cytophotometry.

European Press, Ghent 1978, 447 - 457

L e b e n s l a u f

Am 7. November 1953 wurde ich als einzige Tochter des Regierungsdirektors Theodor Westenberger und seiner Ehefrau Berta, geb. Heinzmann, in Heilbronn-Sontheim geboren. Nach der Versetzung meines Vaters besuchte ich in Stuttgart die Volksschule in den Jahren 1960 bis 1964. Danach trat ich im Hölderlin-Gymnasium Stuttgart in den altsprachlichen Zug ein und machte das große Latinum und das Graecum. Am 23.06.72 bestand ich die Reifeprüfung mit gutem Erfolg und leistete im Anschluß daran den ersten Monat des Krankenpflegedienstes am Christophsbad Göppingen, Privatklinik für Nerven- und Gemütskranke, ab. Für das Wintersemester 1972/73 immatrikulierte ich mich an der Universität Düsseldorf im Fach Medizin und ging nach dem ersten Semester wieder für einen Monat ans Christophsbad. Im August 1974 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab und famulierte nach dem ersten klinischen Semester vier Wochen im Pathologischen Institut der Universität Düsseldorf. Im Sommer 1975 bestand ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und nach einer zweimonatigen Famulatur beim Vertrauensärztlichen Dienst der Landesversicherungsanstalt Rheinprovinz 1977 auch den zweiten Abschnitt. Im Oktober 1977 trat ich in das Praktische Jahr ein, in dem Radiologie mein Wahlfach war.

